



Microcalorimetry contributions to early diagnosis of bacterial infections

Title in Spanish: *Aportaciones de la microcalorimetría al diagnóstico precoz de infecciones bacteriana*

Natividad Lago Rivero¹, Isaac G. Arias Santos², José L. Legido Soto³, Cristina Vázquez Gómez³

¹Servicio de Farmacia. Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (Hospital Álvaro Cunqueiro). C/Camiño dos cañotais nº 44, Vigo (Pontevedra). ²Académico Numerario de la Academia de Farmacia de Galicia. Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia. ³Departamento de Física Aplicada. Facultad de Ciencias. Campus Universitario de Vigo (Lagoas Marcosende), 36310, Vigo (Pontevedra)

ABSTRACT: Microcalorimetry is a highly sensitive experimental technique that determines heat changes in any process or transformation. All organisms produce heat due to their metabolism. Rate of heat flow is an adequate measure of metabolic activity of living beings and their component parts. Microorganisms produce small amounts of heat: 1-3 pW per cell. Although the heat produced by bacteria is very small, their exponential reproduction in a culture medium permits heat detection through microcalorimetry. A thermal conductivity calorimeter of the Calvet type was used. The inside of the calorimeter contains two stainless steel cells (experimental and reference) with a screw on Teflon cap with a hole in the centre. Experiments were carried out with final concentrations of the order of 10^6 , 10^5 , 10^3 and 10 UFC/ml. These were kept at a constant temperature of 309.65 K. The plot of change in heat voltage vs. time enables us to obtain the characteristic growth curve for each bacterial strain. Thermograms were analyzed mathematically allowing us to calculate the constant growth, generation time and the amount of heat exchanged over the culture time.

RESUMEN: La microcalorimetría es una técnica experimental que permite determinar con alta sensibilidad la energía expuesta como consecuencia de cualquier proceso o transformación. Todos los organismos producen calor debido a su metabolismo. La tasa de calor es una medida adecuada de la actividad metabólica de los organismos y sus partes constituyentes. Los microorganismos producen pequeñas cantidades de calor, del orden de 1-3 pW por célula. A pesar de la baja cantidad de calor producido por las bacterias, su exponencial replicación en un medio de cultivo permite su detección mediante microcalorimetría. Se ha utilizado un calorímetro de conducción calorífica tipo Calvet, en cuyo recinto interior se sitúan dos células (experimental y testigo) de acero inoxidable con tapón roscado de teflón perforado en el centro. Las experiencias se llevaron a cabo a concentraciones finales de 10^6 , 10^5 , 10^3 y 10 UFC/ml y se mantuvo una temperatura constante de 309,65 K. La representación de la diferencia de potencial calorífico frente al tiempo permite obtener las curvas de crecimiento características de cada bacteria. Los termogramas se analizaron matemáticamente permitiendo calcular la constante de crecimiento, el tiempo de generación y la cantidad de calor intercambiado.

*Corresponding Author: natividad.lago.rivero@sergas.es

Received: November 10, 2015 Accepted: Mars 10, 2016

An Real Acad Farm Vol. 82, Nº 1 (2016), pp. 91-96

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

Desde las primeras horas de vida, los seres humanos son colonizados por microorganismos, y algunos de ellos vivirán en simbiosis permanente con su huésped en la piel, tracto digestivo, vías respiratorias altas y otros muchos tejidos, constituyendo la flora microbiana normal. Algunos participan en procesos bioquímicos fundamentales para la vida de los seres humanos. Por lo tanto, se establece un equilibrio que se puede ver alterado en determinadas situaciones produciéndose lo que conocemos como infección.

Actualmente, disponemos de una amplia variedad de antibióticos, pero para optimizar su uso, es necesario un método de diagnóstico precoz, que nos permita un inicio temprano del tratamiento, ajustado a las sensibilidades del microorganismo causante y en las condiciones óptimas.

Para los microorganismos, el crecimiento es una respuesta esencial al ambiente fisicoquímico al cual están sujetos. Las bacterias pueden crecer bajo una variedad de condiciones físicas, químicas y nutricionales muy diversas.

El metabolismo es el conjunto total de reacciones químicas que tienen lugar en la célula, y es posible gracias al flujo de energía y a la participación de enzimas.

Las variaciones de calor que se producen como consecuencia de las reacciones químicas que tienen lugar durante el metabolismo, pueden ser empleadas para monitorizar el crecimiento bacteriano.

La tasa de calor es una medida adecuada de la actividad metabólica de los organismos y sus partes constituyentes, células y niveles subcelulares (1). El calor generado por una sola célula está en el rango de 1-80 pW. Células humanas de tejidos conectivos (fibroblastos,

adipocitos...) han reportado tasas metabólicas de aproximadamente 25-80 pW por célula. En contraste, los microorganismos producen pequeñas cantidades de calor, del orden de 1-3 pW por célula. A pesar de la baja cantidad de calor de las bacterias, su replicación exponencial en medios de cultivo permite su detección por microcalorimetría en pocas horas, incluso partiendo de muestras con una baja concentración de bacterias (10 UFC/ml).

La microcalorimetría es una técnica experimental que permite determinar, con alta sensibilidad, la energía expuesta como consecuencia de cualquier proceso o transformación (3,4), lo que la convierte en un método de detección precoz para determinar el crecimiento bacteriano, a partir de la energía intercambiada en su metabolismo (5). Esta técnica se ha utilizado para estudiar el crecimiento y metabolismo de los microorganismos en diferentes condiciones (6-10).

El análisis microcalorimétrico de las especies bacterianas, nos permite conocer a tiempo real las curvas de crecimiento de los diferentes microorganismos. A partir de estos termogramas se puede extraer el valor de parámetros propios de cada bacteria (constante de crecimiento, tiempo de generación, cantidad de calor intercambiado...). Esta técnica permite determinar la presencia de bacterias en menos de 10 horas, incluso partiendo de cultivos con una baja densidad bacteriana (10 UFC/ml), e identificar la especie bacteriana en las primeras 24 horas de cultivo (10).

Los estudios microcalorimétricos también permiten conocer la evolución del metabolismo bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de antibiótico y determinar la concentración mínima inhibitoria (11,12).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Preparación de la muestra

Hemos partido de cultivos puros de cepas de referencia de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Las muestras las muestras se siembran en una placa de agar sangre (bioMérieux®) e incubadas a 310,15 K en una estufa durante 24 horas. A partir de la placa de agar sangre donde han crecido múltiples colonias, preparamos una suspensión de bacterias en fisiológico 0.9%, cuya concentración es ajustada a la correspondiente a 0.5 de la escala McFarland. A partir de esta solución, se hacen las diluciones con fisiológico 0.9% que permitan concentraciones finales de 10^6 , 10^5 , 10^3 o 10 UFC/ml (8, 10).

Las operaciones anteriores son realizadas en la proximidad de un mechero, con la intención de conseguir la esterilidad del proceso.

Como medio de cultivo hemos utilizado un medio líquido de soja-caseína digerida (BACTEC® tipo PEDS PLUS/F).

2.2. Equipo experimental

Las medidas se llevaron a cabo utilizando un microcalorímetro tipo Calvet (13), equipado con un dispositivo que permite el funcionamiento en ausencia de fase de vapor, y que dispone de dos células de aluminio y teflón con una capacidad de 10 ml. Además, cuenta con un multímetro Philips PM2535 y un sistema de adquisición de datos vinculados al microcalorímetro (Fig. 1). El calibrado se realizó eléctricamente utilizando como fuente de corriente constante un EJP30 Setaram. Detalles más concretos del método experimental han sido publicados por la Profesora Paz Andrade (14).

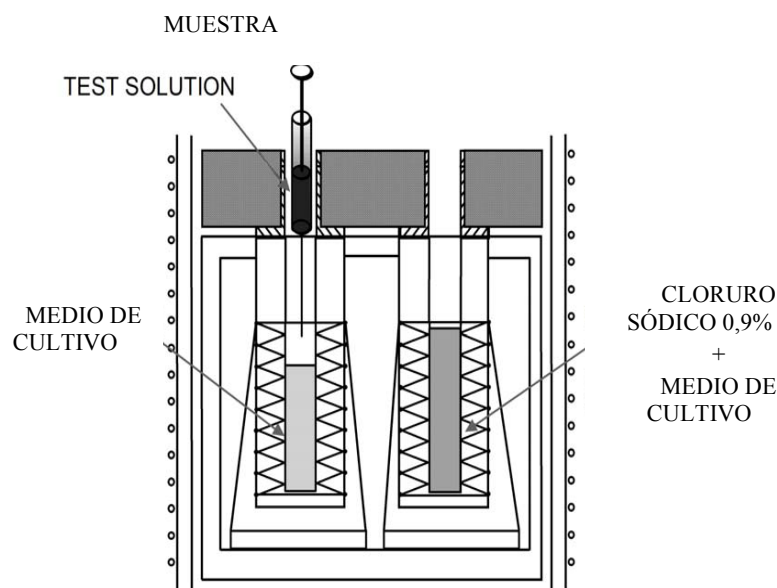


Figura 1. Montaje experimental

2.3. Montaje experimental y recogida de datos

En el recinto externo del calorímetro se ha mantenido una temperatura constante de 309,65 K. En la célula testigo se incorporan 7 ml de medio de cultivo más 1ml de suero fisiológico, y en la experimental 7ml de medio de cultivo. Ambas células se introducen a través de dos orificios cilíndricos, paralelos entre sí, que van desde la parte superior del microcalorímetro hasta el recinto interno de las termopilas. La gran distancia que separa las células de la entrada, permite minimizar los efectos de conducción calorífica hacia el exterior. El sistema se deja estabilizar durante aproximadamente dos horas, momento en el que se introduce en la célula experimental 1ml de la concentración establecida.

La experiencia también se ha realizado con una muestra sin bacterias (control).

Los datos son recogidos por el sistema de adquisición y tratamiento de datos, a intervalos de 15 segundos durante el tiempo que dure la experiencia. La precisión en la señal calorimétrica es de un 1 μ V.

3. RESULTADOS

Representando la diferencia de potencia calorífica generada entre las células experimental y testigo frente al tiempo, obtenemos las gráficas de crecimiento de las bacterias. En ellas se pueden identificar las diferentes fases de crecimiento bacteriano: latencia, exponencial, mantenimiento y muerte celular.

Las curvas obtenidas presentan una forma característica que se repite para cada bacteria a todas las concentraciones estudiadas, comportándose como una huella térmica. En las figuras 2-4, podemos observar el comportamiento térmico de las enterobacterias *E. coli*, *P. mirabilis* y *K. pneumoniae* a diferentes concentraciones (15).

Como podemos observar en las gráficas, existe una relación inversamente proporcional entre el tamaño del inóculo y el tiempo hasta la detección de la señal, siendo este menor a medida que aumentamos la concentración del cultivo. En cualquier caso, incluso para concentraciones bajas (10 UFC/ml) antes de 8 horas podemos identificar crecimiento bacteriano en la muestra. La aparición de los picos máximos sigue un orden relativo a la concentración, y aunque a altas concentraciones los picos son más intensos, no se puede establecer una relación de proporcionalidad.

En los termogramas de las enterobacterias estudiadas se observan diferencias y similitudes que podrían responder al tipo de fermentación de la glucosa; *E. coli* y *P. mirabilis* presentan una fermentación ácido-mixta, mientras que *K. pneumoniae* se caracteriza por presentar una fermentación butanodiólica.

En el caso de *E. coli* y *P. mirabilis* se manifiestan dos fases metabólicas, la primera de mayor energía y menor duración, seguida por un periodo de latencia que precede a un segundo periodo de menor potencia pero que se prolonga en el tiempo. La principal diferencia entre los

perfiles de estas bacterias es el tiempo que separa los dos picos de flujo, ya que se observa que este periodo es mayor en las muestras de *E. coli*. En el caso de *P. mirabilis*, tras el primer pico característico de todos los termogramas, y antes del primer pico de máximo voltaje, se describe una zona en la que no llega a manifestarse un vértice, pero que se ha ajustado a una ecuación de tipo polinómico y de la que hemos podido extraer un punto de inflexión.

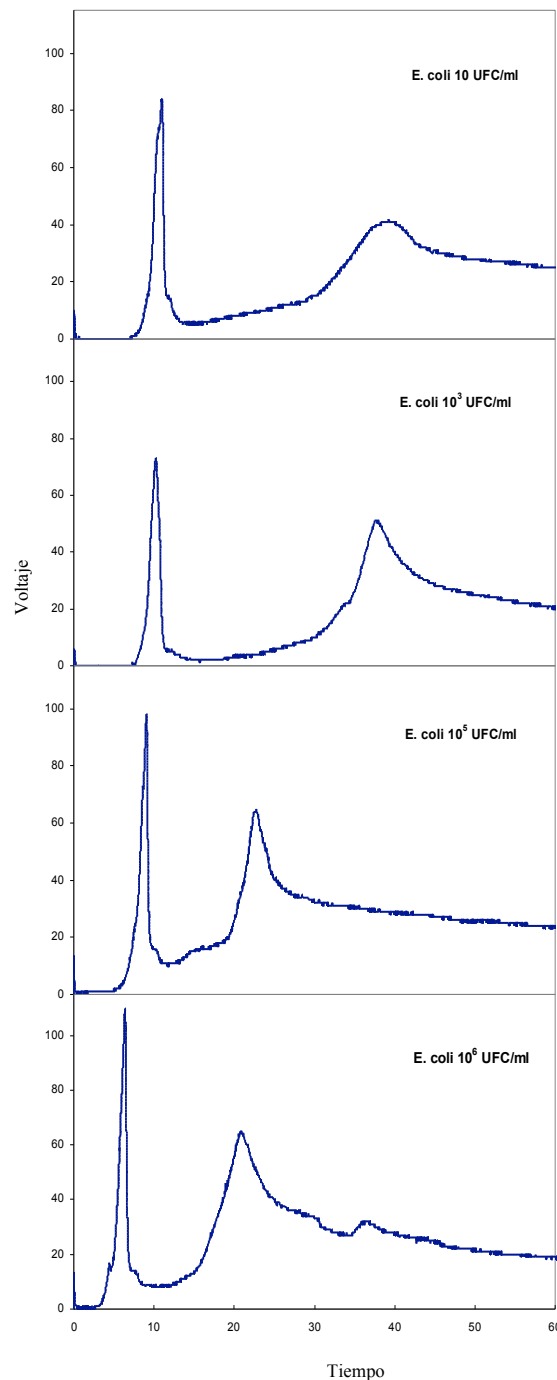


Figura 2. Termogramas de *E. coli* (μ V \rightarrow t (horas)).

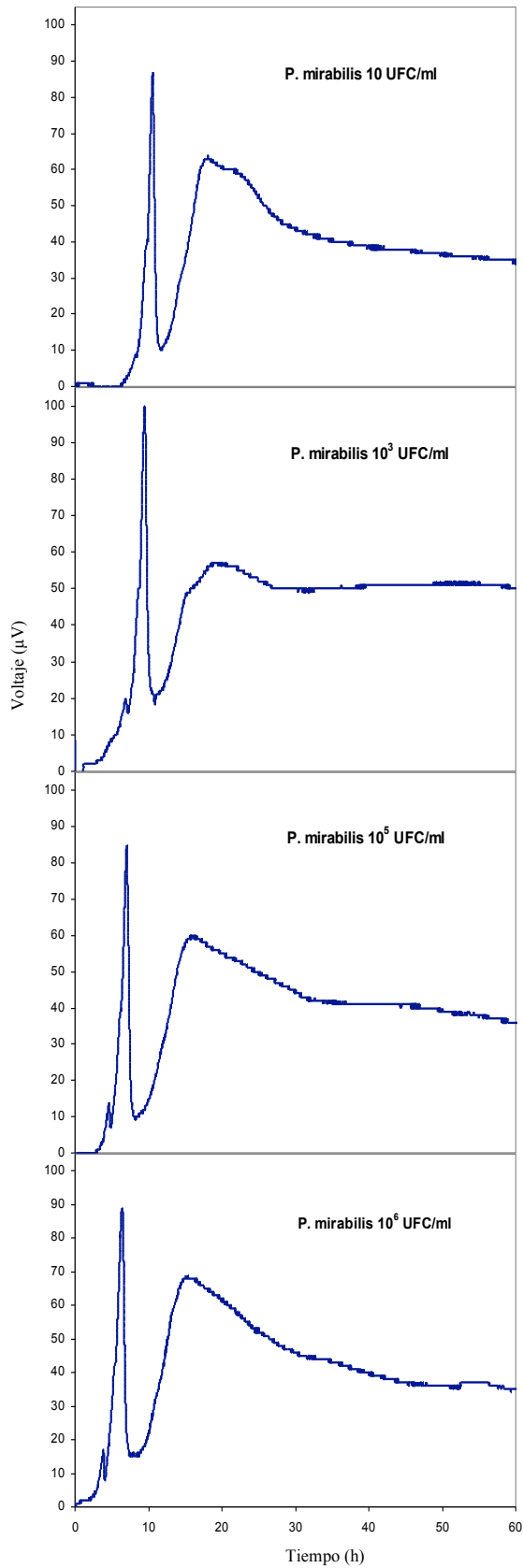


Figura 3. Termogramas de *P. mirabilis* (µV→t (horas)).

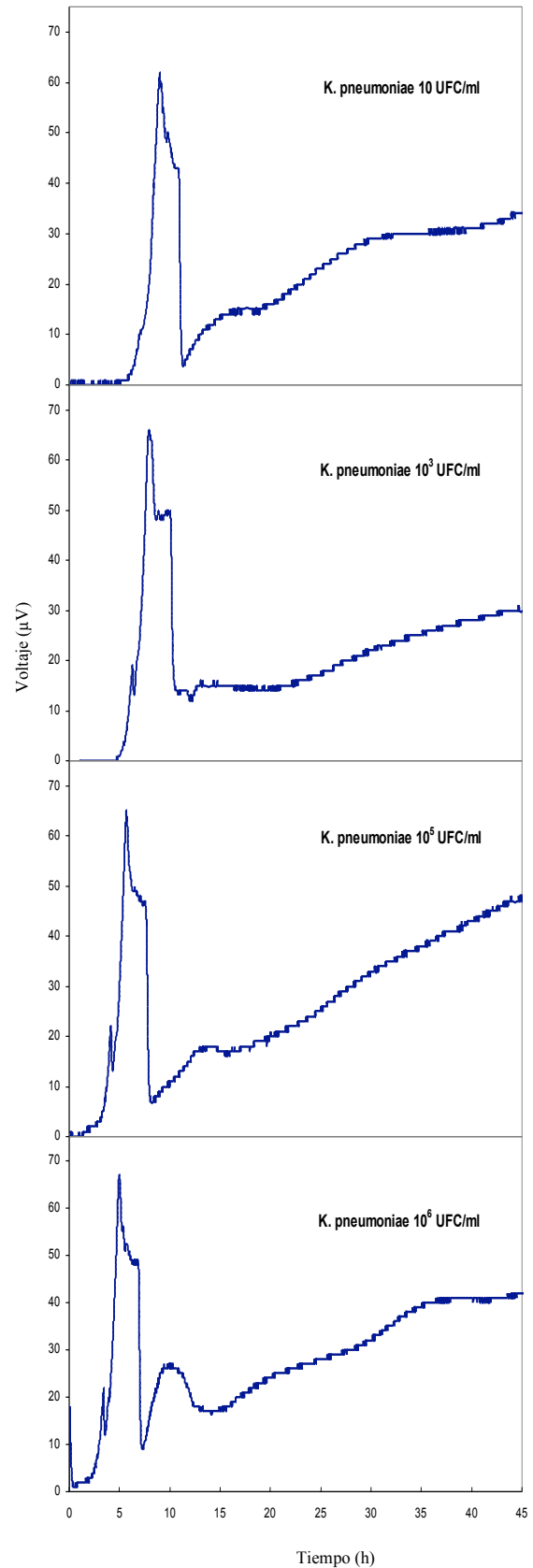


Figura 4. Termogramas de *K. pneumoniae* (µV→t (horas)).

En cuanto al termograma de *K. pneumoniae*, es claramente diferente al de las otras enterobacterias comentadas. En este caso se observa una primera fase característica, en la cual tras el pico máximo se traza una meseta previa a un descenso brusco hasta niveles muy bajos, del orden de 10 μV . Tras este punto se percibe un incremento exponencial del flujo de calor, sin llegar a un pico máximo durante el tiempo que dura la experiencia.

Los resultados obtenidos han sido tratados matemáticamente, ajustándose a ecuaciones de tipo exponencial y polinómico. En la fase logarítmica de la curva de crecimiento los datos obtenidos se han ajustado a una ecuación exponencial. En esta fase de la curva de crecimiento, la proliferación microbiana se puede expresar como:

$$n_t = n_0 \times \exp(k \times t) \quad (1.1)$$

donde n_0 es el número de células a tiempo 0, y n_t el número de células a tiempo t y k es la constante de crecimiento (16).

Si consideramos P_w como la energía desprendida por cada célula, entonces:

$$n_t P_w = n_0 \times P_w \times \exp(k \times t) \quad (1.2)$$

Teniendo en cuenta que la energía desprendida a t cero es P_0 y P_t a tiempo t:

$$P_t = P_0 \times \exp(k \times t) \quad (1.3)$$

$$\ln P_t = \ln P_0 + k \times t \quad (1.4)$$

Se define tiempo de generación (G) como el tiempo que tarda una población en duplicar su número, y se expresa como:

$$G = \frac{(\ln 2)}{k} \quad (1.5)$$

Por lo tanto, a partir del ajuste matemático de los valores de potencia obtenidos en el estudio microcalorimétrico de cultivos bacterianos podemos extraer de forma rápida y sencilla el valor de la constante de crecimiento y del tiempo de generación de la bacteria objeto de estudio.

Del termograma también podemos extraer la cantidad de calor (Q) intercambiado durante el tiempo que dura la experiencia.

$$Q = K \cdot A \quad (1.6)$$

Donde, A ($\mu\text{V} \cdot \text{h}$) representa el área, calculada por el método trapezoidal, y K es una constante cuyo valor 24,8 $\text{J}/\mu\text{V} \cdot \text{h}$ fue calculada a partir del calibrado eléctrico realizado por efecto Joule del equipo.

4. DISCUSIÓN

Cada persona está colonizada por un número de células bacterianas superior al número de células que forman parte del organismo. Normalmente, se establece una relación simbiótica entre la bacteria y el hospedador, aunque en ocasiones este equilibrio se rompe produciéndose una

infección. A pesar del amplio arsenal terapéutico disponible, las enfermedades infecciosas siguen siendo una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. En este sentido es determinante un método de diagnóstico precoz que permita un inicio temprano del tratamiento antibiótico ajustado a las sensibilidades del agente causal.

La microcalorimetría es una técnica analítica de medida del calor producido o consumido por reacciones químicas o cambios físicos de estado, incluyendo el calor intercambiado durante los complejos procesos biológicos. Ha sido usada en biología, farmacología, biotecnología y ecología por su alta sensibilidad, precisión y simplicidad, sin embargo, el uso en clínica ha sido muy limitado (6,17).

La microcalorimetría permite determinar la presencia de microorganismos en la muestra en pocas horas, ya que aunque el inóculo inicial presente una baja concentración de bacterias, su exponencial replicación hace posible medir el calor generado como consecuencia de su metabolismo. Esta información tiene una gran relevancia desde el punto de vista clínico, ya que como podemos ver en los termogramas obtenidos en este trabajo, es posible identificar la presencia de enterobacterias en una muestra en menos de 8 horas, incluso en las muestras menos concentradas (10 UFC/ml).

Además, teniendo en cuenta las experiencias realizadas, podemos decir que en un medio de cultivo definido cada especie analizada presenta un perfil de crecimiento que se repite a todas las concentraciones estudiadas, obteniendo una “huella térmica” de cada bacteria, e incluso permitiendo diferenciar especies del mismo género (11). Esta curva calorimétrica está definida por una serie de puntos de fuerza electromotriz registrados por el sistema de adquisición de datos, y que responden al intercambio energético que se produce durante el periodo de cultivo, permitiendo la identificación de la especie bacteriana.

En los termogramas se registran una serie de picos de energía que posiblemente estén asociados a la capacidad que tiene cada microorganismo de asimilar los diferentes componentes del medio de cultivo. Cabe destacar las similitudes observadas entre los termogramas de *E. coli* y *P. mirabilis*, dos especies que presentan el mismo tipo de fermentación de la glucosa, ácido-mixta, mientras que *K. pneumoniae* caracterizada por una fermentación butanodiólica muestra un termograma radicalmente diferente.

Los resultados obtenidos han sido tratados matemáticamente, permitiendo conocer de forma rápida y sencilla el valor de la constante de crecimiento (K) y el tiempo de generación (G), parámetros característicos de cada especie bacteriana y que para conocerlos por los métodos habituales se requieren técnicas muy laboriosas. Además, la microcalorimetría permite cuantificar la cantidad de calor intercambiado (Q) en un cultivo bacteriano durante un periodo definido. El conocimiento de estos parámetros abre las posibilidades de nuevos estudios, que permitan conocer el comportamiento de una

especie bacteriana en presencia de diferentes sustancias, por ejemplo antibióticos, contribuyendo al conocimiento de las sensibilidades de los microorganismos a las diferentes opciones terapéuticas.

5. CONCLUSIONES

La microcalorimetría ha demostrado ser una técnica muy útil y eficiente en la detección precoz de bacterias en un medio de cultivo. Permite detectar y cuantificar muy pequeñas cantidades de energía intercambiada y en consecuencia detectar crecimientos bacterianos, aun con muy pequeños inóculos, 10 UFC/ml, en pocas horas.

Las curvas calorimétricas obtenidas permiten caracterizar cualitativamente la bacteria estudiada, haciendo posible la identificación de la especie en las primeras 24 horas de cultivo.

Por lo tanto, la microcalorimetría se presenta como una técnica capaz de determinar el agente causal de la infección en menos de 24 horas horas, consiguiendo un diagnóstico precoz que permita un inicio temprano del tratamiento. Además, esta técnica abre las posibilidades de nuevos estudios que nos acerquen a un mayor conocimiento del comportamiento de las bacterias en presencia de determinadas sustancias.

6. REFERENCIAS

1. Trampuz A, Salzmann S, Antheaume J, Daniela, AU. Microcalorimetry: a novel method for detection of microbial contamination in platelet products. *Transfusion* 2007; 47: 1643-50.
2. Calvet E, Prat H. Récents progrès in microcalorimétrie. Paris: Dunod 1958.
3. Paz Andrade MI. Les Développements Récents de la Microcalorimétrie et de la Thermogenese, 1st Ed. Paris: CRNS 1967.
4. Braissant O, Wirz D, Göpfert B, Daniela U. Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiology letters* 2010; 303: 1-8.
5. Rodríguez BV, Contreras R, Almora E. Estudio microcalorimétrico del crecimiento de dos especies de micoplasma. *Interferón y Biotecnología* 1989; 6, 2: 191-5.
6. Thomas M, Wolfgang B. Thermokinetic description of anaerobic growth of *Halomonas halodenitrificans* using a static microcalorimetric ampoule technique. *Journal of Biotechnology* 2003; 101: 267-74.
7. Ma J, Qi WT, Yang LN, Yu WT, Xie YB, Wang W. Microcalorimetric study on the growth and metabolism of microencapsulated microbial cell culture. *Journal for Microbiological Methods* 2007; 68: 172-7.
8. Lago N, Legido JL, Arias I, García F. Aplicaciones de la microcalorimetría como método de identificación precoz del crecimiento bacteriano. *Investigación, cultura, ciencia y tecnología* 2010; 2, 3: 6-9.
9. Lago_a N, Legido JL, Paz-Andrade MI, Arias I, Casás LM. Microcalorimetric study on the growth and metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2011; 105: 651-5.
10. Lago N, Legido JL, Arias I, Casás L. Microcalorimetric study of the growth of *Enterococcus faecalis* in an enriched culture medium. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 2012; 108, 2: 665-70.
11. Von Ah U, Dieter W, Daniels AU. Rapid differentiation of Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from Methicillin-Resistant *S. aureus* and MIC Determinations by Isothermal Microcalorimetry. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46, 6: 2083-7.
12. Von Ah U, Dieter W, Daniels AU. Isothermal microcalorimetry –a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and referente strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiology* 2009; 9: 106.
13. Calvet E, Prat H. Microcalorimétrie: Applications physico-chimiques et biologiques. Paris: Masson et C^{ie} 1956.
14. Paz Andrade MI. Les Développements Récents de la Microcalorimétrie et de la Thermogenese, 1st Ed. Paris: CRNS 1967.
15. Lago N, Legido JL, Arias I, Casás L. Comparative study of microcalorimetric behavior of *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Microbiology* 2012; 61, 4: 165-8.
16. Ma J et al. Microcalorimetric study on the growth and metabolism of microencapsulated microbial cell culture. *Journal for Microbiological Methods* 2007; 68: 172-7.
17. Baldoni D et al. Performance of Microcalorimetry for Early Detection of Methicillin Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* 2009; 47, 3: 774-6.